DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.050
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
1236 2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1236-03

负载胃癌酸洗抗原树突状细胞诱导高效特异的抗胃癌细胞效应

吴 淼[1],余佩武[1],蔡志民[1],吴 军[2],王自强[1],周立新[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]普通外科;[2]全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究负载胃癌酸洗抗原树突状细胞(DC)诱导的特异性CTL对胃癌细胞的杀伤效应。方法 酸洗涤法获得SGC7901细胞膜抗原多肽,GM-CSF、IL-4和TNF-a体外诱导扩增DC并负载酸洗抗原,制备胃癌抗原特异性CTL;用Cyto Tox 96TM检测其对SGC7901体外杀伤效应。结果 负载胃癌抗原肽的DC诱导的特异性CTL对SGC7901的杀伤率达88.95%,显著高于LAK细胞的杀伤率($P<0.05$)。且其对同种不同分化类型的胃癌细胞株MGC803、MNK28也有较高的杀伤效应,而对LOVO及HepG2肿瘤细胞株无显著杀伤作用($P>0.05$)。结论 负载胃癌抗原的DC体外可诱导出高效而特异的抗胃癌效应,提示以DC为中心的肿瘤生物治疗可望提高胃癌综合治疗水平。

关键词:树突状细胞;细胞毒性淋巴细胞;胃癌;生物治疗
中图法分类号:R392.11;R73-362;R735.2 文献标识码:A

Efficient and specific effects of tumor specific CTL induced by dendritic cells loaded with gastric carcinoma antigen

WU Miao, YU Pei-wu, CAI Zhi-ming, WU Jun, WANG Zi-qiang, ZHOU Li-xin (Department of General Surgery, Southwest Hospital of PLA, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract: Objective To explore the cytotoxic effect of tumor specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) induced by gastric cancer peptide-pulsed DC on gastric cancer cells. Methods Peptide of gastric cancer strain (SGC7901) was obtained by citrate-phosphate buffer elution. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were cultured under the condition of GM-CSF (1 000 U/ml) + IL-4 (1 000 U/ml) + TNF-α (100 ng/ml). The tumor antigen specific CTL was generated from activated autologous T cell by acid-eluted peptide pulsed DC. And the cytotoxicity of CTL to SGC7901 was assayed by Cyto Tox96™ kit *in vitro*. Different tumor cell lines and LAK cells were used as control in these experiments. Results The killing rate of SGC7901 by the antigen specific CTL reached at 88.95%, nearly twice as high as that of control. The CTL had much higher cytotoxicity to different differentiated type of gastric cancer cells such as MGC803 and MNK28, as compared with LOVO and HepG2 tumor cells ($P<0.01$). Conclusion DC might have potential value in clinical biotherapy of gastric cancers.

Key words: Dendritic cell; cytotoxic T lymphocyte; gastric cancer; biotherapy

肿瘤生物治疗是近年来出现的肿瘤治疗新方法;也是肿瘤治疗的发展趋势。树突状细胞(Dendritic cell, DC)是功能最强大的"专职"抗原提呈细胞(Antigen presenting cells, APCs),具有独特的抗原提呈和激发功能,作为免疫反应的核心和关键。在肿瘤细胞和T淋巴细胞的相互作用中起桥梁和枢纽作用[1],以DC为中心的肿瘤生物治疗是发展的主要方向之一。本研究用DC负载酸洗脱胃癌细胞表面的抗原多肽,体外诱导胃癌抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL),研究其对胃癌细胞的杀伤效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胃癌细胞株SGC7901、MGC803(购自重庆市消化病研究所),人胃癌细胞株MNK28(购自上海市肿瘤研究所),人肝癌细胞株HepG2(购自中国人民解放军传染病中心),人结肠癌细胞株LOVO(本实验室保存)。

1.1.2 人外周血 来自正常献血员外周静脉血。

1.2 方法

1.2.1 胃癌抗原制备 根据文献[2]约略加改进。收集培养中对数生长期的SGC7901细胞,用pH 3.3的柠檬酸洗脱液作用50 s,然后1 000 r/min,5 min;小心收集上清液,置-80 ℃冻存备用。酸洗后的细胞立即以RPMI1640培养基洗涤3遍,并继续培养,每24~28 h重复洗脱1次,每次保证所收集的细胞在1×10^9/L以上。所获的酸洗液经SepPak18去盐柱去盐,然后收集经Centricon-3超离后的滤液。获得SGC7901胃癌抗原多肽,并对酸洗后的细胞进行抗原性检测。

1.2.2 DC的分离、诱导、负载抗原以及诱导抗原特异性CTL

用梯度离心法从健康人和胃癌患者外周血中分离获得外周血单个核细胞(PBMC)悬于含20%胎牛血清的RPMI1640中,加rhGM-CSF 500 U/ml、rhIL-4 1000 U/ml在37 ℃,5% CO_2,条件培养箱诱中培养[3]。第3天向DC诱导体系中加入上述胃癌抗原和培养的SGC7901,与诱导中的DC孵育,以制备负载胃癌抗原的DC。第5天加入TNF-α 100 ng/ml,第7天收集已负载抗原的DC与根据文献[4]分离T淋巴细胞混合培养5 d,诱导抗原特异性CTL[5]。

1.2.3 细胞毒性检测 以DC诱导的抗原特异性CTL,LAK细胞、未负载抗原的单纯DC诱导的T淋巴细胞、胃癌抗原直接诱导的T淋巴细胞以及未经诱导的T淋巴细胞作为效应细胞,

作者简介:吴 淼(1969-),男,重庆市人,硕士,医师,主要从事胃肠道肿瘤生物治疗研究。电话:(023)68754000-73172

收稿日期:2001-09-25;修回日期:2001-12-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以GC7901、MNK28、MGC803、HepG2、LOVO 为靶细胞, 效靶比分别在 1∶12.5、1∶25、1∶50 采用 Cyto Tox 96™试剂盒进行细胞毒性实验。杀伤活性以下式计算:

$$\text{杀伤活性}(\%)=\frac{\text{实验孔}A\text{值}-\text{效应细胞孔自发释放}A\text{值}-\text{靶细胞自发释放}A\text{值}}{\text{靶细胞孔最大释放}A\text{值}-\text{靶细胞孔自发释放}A\text{值}}\times 100\%$$

1.2.4　统计学处理　　数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 软件进行 t 检验分析。

2　结果

酸洗后 SGC7901 抗原性的检测: 胃癌特异性 CTL 对酸洗后的SGC7901 杀伤率在各个效靶比均较酸洗前显著降低($P<0.01$), 同其对无关肿瘤细胞 HepG2 的杀伤率相比无显著差异($P>0.05$), 见表 1。

表 1　特异性 **CTL** 对酸洗前后 **SGC7901** 杀伤作用(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Cytotoxicity of specific CTL to SGC7901 before and after elution(%, $\bar{x}\pm s$)

Group	Ratio of effector to target cells(E∶T)		
	12.5∶1	25∶1	50∶1
SGC7901(Before elution)	54.84±9.13	74.51±8.17	88.95±9.39
SGC7901(After elution)	6.11±1.80 *	7.63±2.08 *	9.04±2.15 *
HepG2	5.68±1.72	7.10±1.90	8.30±3.12

*: $P<0.01$ *vs* before eltion group

负载胃癌酸洗抗原 DC 诱导的 CTL 对SGC7901 有强大的杀伤作用, 与 LAK 细胞相比有非常显著差异($P<0.01$)。负载胃癌抗原 DC 对 SGC7901 无杀伤作用。未经 DC 诱导的 T 细胞对 SGC7901 无显著杀伤作用与对无关肿瘤 HepG2 类似, 见表 2。

表 2　负载抗原 **DC** 诱导的 **CTL** 对 **SGC7901** 的杀伤作用比较(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Cytotoxicity of specific CTL induced by eluted antigene-plused DC to SGC7901(%, $\bar{x}\pm s$)

Group	E∶T		
	12.5∶1	25∶1	50∶1
LAK+SGC7901	23.17±6.26★	28.91±5.83★	44.53±5.56★
Specific CTL+SGC7901	54.84±9.13	74.51±8.17	88.95±9.39
DC+ SGC7901	1.58±1.23 *	1.94±1.11 *	2.27±1.30 *
Antigen+T cell+SGC7901	1.41±1.25 *	1.45±1.03 *	2.14±1.46 *
T cell+SGC7901	1.06±0.79 *	1.80±1.27 *	1.68±1.03 *
T cell+HepG	1.25±0.99 *	1.35±1.04 *	1.38±0.95 *

★: $P<0.05$, ♯: $P<0.05$, *: $P<0.01$ *vs* specific CTL group

负载胃癌抗原 DC 诱导的特异性 CTL 对SGC7901 的杀伤作用显著高于对分化不同的同种胃癌细胞株 MNK28 和 MGC803($P<0.05$), 对 3 种胃癌细胞株的杀伤作用又显著高于对无关肿瘤细胞株 LOVO、HepG2 的杀伤作用($P<0.01$), 见表 3。

表 3　负载酸洗抗原 **DC** 诱导的 **CTL** 对不同肿瘤细胞的杀伤作用(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Cytotoxicity of specific CTL induced by eluted antigen-plused DC to different type of tumor cells(%, $\bar{x}\pm s$)

Group	E∶T		
	12.5∶1	25∶1	50∶1
SGC7901	54.84±9.13	74.51±8.17	88.95±9.39
MNK28	40.41±4.56 ♯	49.86±5.81 ♯	61.75±8.84 ♯
MGC803	39.28±3.68 ♯	44.27±5.60 ♯	52.23±6.45 ♯
LOVO	5.67±1.03 *	7.47±2.12 *	9.11±3.42 *
HepG2	5.68±1.72 *	7.10±1.90 *	8.30±3.12 *

♯: $P<0.05$ *vs* SGC7901 group, *: $P<0.01$ *vs* SGC7901、MNK28、MGC803 group

3　讨论

诱导肿瘤特异性 CTL 是抗肿瘤免疫反应的关键, 而 CTL 的特异性取决于肿瘤抗原的特异性。虽然胃癌特异性抗原尚不明确, 然而 T 淋巴细胞识别的是结合于肿瘤细胞或 APC 表面与 MHC－1 类分子多肽结合沟内的抗原多肽。因此, 提取这种抗原多肽来诱导 CTL, 可以实现对肿瘤的特异性免疫。微酸洗涤法可以特异地把该多肽分离出来, 而对与MHC-Ⅱ和其他非 MHC 结合的抗原无影响, 也不会引起多肽结构改变, 使酸洗物成分相对单一[6]。因此, 以微酸洗涤 SGC7901 细胞方法获取肿瘤原能够保留其特异性。我们实验中特异性 CTL 对酸洗前后的 SGC7901 杀伤作用的对比也符合此观点。

肿瘤出现免疫逃逸的一个很重要的原因是肿瘤细胞低表达或不表达 MHC 分子和共刺激分子, 使抗原不能被有效提呈给 T 细胞以产生特异性的抗瘤效应。因此激发有效的T 细胞介导的抗瘤免疫反应是提高肿瘤免疫治疗效果的关键。单纯的抗原不能活化 T 淋巴细胞, 必须经过 APC 提呈; 因为 T 淋巴细胞活化需要抗原和辅助分子双信号才能有效地诱导 CTL 形成, 发挥抗瘤效应[7]。

DC 是体内功能最强大的 APC, 具有独特的抗原提呈和免疫激发功能, 在肿瘤细胞和 T 淋巴细胞间起作枢纽和桥梁作用, 因此 DC 在肿瘤的发生、发展和免疫治疗中发挥着重要的作用[8]。研究发现肿瘤抗原不被 DC 提呈就不能有效地诱导出抗瘤免疫; 肿瘤组织中的 DC 分布量与肿瘤的疗效和预后成副相关[9]。然而, 在肿瘤微环境中, DC 数量有限、局部调节 DC 的活性物质不足以及肿瘤和细胞分泌抑制 DC 功能的细胞因子等原因, 致使 DC 抗原提呈能力十分有限[10]。因此, 在体外进行 DC 诱导、扩增, 并负载相应的肿瘤抗原, 然后再回输体内, 对肿瘤过继免疫治疗显得十分重要, 这也是当前研究的热点。

本实验用胃癌抗原多肽负载 DC 后诱导胃癌特异性CTL, 结果显示其对胃癌细胞株 SGC7901 的杀伤率可高达 88.95%, 显著高于 LAK 细胞的作用, 提示 DC 可有效地捕获、提呈了胃癌抗原并诱导出胃癌抗原特异性 CTL, 产生高效的抗胃癌效应; 实验还发现其对同类型不同分化程度的胃癌细胞株 MNK28 和 MGC803 的杀伤作用虽然低于对 SGC7901, 但仍具有较高的杀伤作用; 说明它们虽然同为人胃癌细胞株, 但其分化程度不一样, 其抗原存在差异, 但另一方面提示它们同为胃癌细胞株, 具有相似的抗原, 从而表现出较无关肿瘤细胞 LOVO、HepG2 具有明显高的杀伤效应; 这对临床胃癌疫苗的应用提供了一个思路。实验同时显示该特异性 CTL 对其他类型的肿瘤细胞株 LOVO 和 HepG2 则

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

无显著杀伤作用。提示 DC 负载胃癌抗原诱导的 CTL 对胃癌具有高度特异性。另外,实验结果显示,单纯胃癌特异性抗原多肽未经 DC 提呈而直接刺激 T 淋巴细胞,其诱导的 T 淋巴细胞对 SGC7901 无显著杀伤作用,且与未经抗原诱导的 T 淋巴细胞对 SGC7901 以及无关肿瘤细胞 HepG2 的杀伤作用相似,说明未经 DC 提呈抗原就不能诱导出有效的肿瘤特异性 CTL 而发挥抗瘤效应,充分显示了 DC 的抗原提呈作用在抗瘤免疫反应中重要地位。

DC 在肿瘤生物治疗中的应用是近年来研究的一个新领域,其发展迅速,同时也有很多问题有待进一步研究解决。但是众所周知,通过目前的治疗手段难以根治肿瘤。如能激发机体的主动抗瘤免疫反应,则有望解决这一问题。通过 DC 提呈抗原诱导肿瘤特异性 CTL 进行过继免疫治疗,给肿瘤的治疗开辟一条新的思路。本研究为胃癌临床的 DC 治疗提供了一定的实验依据。

参考文献:

[1] Nair S K, Synder D, Rouse B T, *et al*. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts [J]. Int J Cancer, 1997, 70(6): 706—715.

[2] Storkus W J, Zeh H J, Salter R D, *et al*. Identification of T-cell epitope: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution[J]. J Immunother, 1993, 14(2): 94—103.

[3] 朱学军, 曹雪涛. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1997, 4(4): 302—306.

[4] 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 158—167.

[5] Peiper M, Goedegebuure P S, Eberlein T J. Generation of peptide-speific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells capable of lysing human pancreatic cancer cells[J]. Surgery, 1997 Aug; 122(2): 235—241.

[6] Runnels H A, Moore J, Jensen P, *et al*. A structural transition in class II major histocomatibility complex proteins at mildly acidic pH[J]. J Exp Med, 1996, 183(1): 127—136.

[7] Sigal L J, Reiser H, Rock K L. The role of B7-1 and B7-2 costimulation for the generation of CTL responses in vivo[J]. J Immunol, 1998, 161(6): 2 740—2 745.

[8] Angevin E, Andre F, Zitvogel L. Antitumor cellular immunotherapy: the breakthrough of dendritic cells[J]. Bull Cancer, 2000, 87(1): 107—115.

[9] Maehara Y, Tomisaki S, Oda S, *et al*. Lymph node metastasis and relation to tumor growth potential and local immune response in advanced gastric cancer[J]. Int J Cancer, 1997, 74(2): 224—228.

[10] Kiertscher S M, Luo J, Dubinett S M, *et al*. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells[J]. J Immunol, 2000, 164(3): 1 269—1 276.

(编辑 汪勤俭)

(上接 1135 页)

致。将各组 PA IgG 值升高视为阳性, PA IgG 值正常视为阴性。122 例 ITP, 有 98 例 PA IgG 值在 120 ~ 2073.68 ng/10^7 PA, 阳性率为 80.3 %, 24 例 PA IgG 值在正常范围, 占 19.7 %。两组与对照组的关系见表 1。

表 1 检测 **PA IgG** 阳性结果

组别	n	PLT(×10^9/L)	降低(%)	PA IgG(ng/10^7PA)	升高(%)
对照组	25	135.00±18.02	0	44.63±11.43	0
AITP	36	14.31±4.52	36(100)	166.83±48.31 *	30(83.3)
CITP	86	39.52±7.35	86(100)	138.90±25.42 *	68 (79.1)

*: $P<0.001$ 与正常对照组相比

急、慢性 ITP 经治疗有效后, 临床出血症状明显减轻, 复查 16 例患者的 PA IgG 的值, 按疗效标准[1] 分四级: 显效、良好、进步、无效。结果见表 2。

表 2 **PA IgG** 与疗效的关系

疗效	n	PLT× 10^9/L		PAIg(ng/10^7PA)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
良好	7	21.3±8.96	102.35±30.24	250.12±45.84	43.67±5.64
进步	5	16.5±5.33	72.65±8.31	134.65±35.89	78.32±8.67
无效	4	19.5±6.49	25.76±4.12	119.45±39.21	98.24±8.16

*: $P<0.01$ 与治疗前比较

3 讨论

ITP 发病的重要原因之一是免疫因素的参与, 导致血小板的生成减少和破坏增加, 计数减少; 其诊断主要靠临床表现、病史、实验室检查(如血常规、骨髓穿刺、PA IgG)等, 许多报道肯定 PA IgG 检测在 ITP 诊断中的敏感性[2,3], 当患者临床各项指标均符合 ITP, PA IgG 检测又增高, 对临床诊断更有帮助。因此, PA IgG 的检测仍不失为有效的临床诊断的参考指标, 有一定的临床意义。本文 ITP 的 PA IgG 检测的阳性率在 AITP 组为 83.3 %, CITP 组 79.1 %, 与文献[4] 报道相似。

对 16 例 ITP 患者行治疗前后的 PA IgG 的检测并进行比较, 治疗有效时, PLT 计数上升, 而 PA IgG 值下降, 两者呈负相关。文献报道 PA IgG 破坏血小板机理主要是血小板相关抗体先与血小板抗原特异性结合形成抗原抗体复合物, 然后通过 IgG 的 Fc 段与巨噬细胞 Fc 受体结合, 导致血小板被吞噬破坏, 造成循环中血小板减少。定量测定 PA IgG, 对 ITP 的诊断及疗效判断有一定的临床指导意义。

关键词: 血小板相关抗体; 检测; 血小板计数
中图法分类号: R446.6; R558.2 文献标识码: B

参考文献:

[1] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 2 版. 北京: 科技出版社, 1998. 279—281.

[2] 杨锦媛, 徐瑞冰, 徐静山. 原发性血小板减少性紫癜免疫学诊断的研究[J]. 中华血液学杂志, 1987, 8(5): 260—263.

[3] 沈志强. 血小板相关 IG、M 和 C3 测定的临床意义[J]. 中华血液学杂志, 1984, 5(3): 153—154.

[4] 胡兆平, 陶良军, 王红梅. 血小板相关抗体(PA IgG)在 6 种疾病中的研究[J]. 江西医学检验, 1999, 17(5): 3—4.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net